

بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین



معاونت پژوهشی

فرم پیش نویس طرح پژوهشی

عنوان طرح: بررسی تاثیر آتورواستاتین بر میزان بروز آپوپتوز در اووسیت های کشت داده شده موش سوری در محیط آزمایشگاه (In vitro)

نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان: پوریا سلیمانی

دانشکده/مرکز تحقیقاتی: مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

قسمت دوم- اطلاعات مربوط به طرح پژوهشی

الف-۱-۲ عنوان طرح به فارسی:

بررسی تاثیر آتورواستاتین بر میزان بروز آپوپتوز در اووسیت های کشت داده شده موش سوری در محیط آزمایشگاه (In vitro)

ب-۱-۲ عنوان طرح به انگلیسی:

The effect of atorvastatin on mature mouse oocytes apoptosis by the method of in vitro

۲-۳ بیان مسأله و بررسی متون (در صورت نیاز از حداکثر ۲ صفحه اضافی استفاده و کد مراجع را پی در پی ذکر نمائید).

ناباروری یک موضوع سلامت عمومی است . نرخ جهانی زوج های نابارور بین ۱۲ تا ۱۴ درصد است که در این میان انگلستان با ۷ درصد (کمترین) زوج های نابارور در رتبه نخست و آفریقا با ۳۰ درصد (بیشترین) زوج نابارور در رتبه آخر جهان قرار گرفته است. در سال ۱۹۳۵ Pincus & Enzmann گزارش کردند که اووسیت های نابالغ خرگوش می توانند در محیط آزمایشگاه بلوغ یافته و لقاح یابند. در سال ۱۹۹۱ Cha و همکاران اولین تولدی را که با تکنیک IVM اووسیت صورت گرفته بود گزارش کردن(۱). IVM در بیمارانی که در معرض ریسک بالای OHSS: Ovarian Hyperstimulation Syndrom می باشند مانند زنانی که مبتلا به Ovary Syndrom PCOS:

Polycystic یا زنانی با سابقه OHSS، بیمار با محدودیت زمانی برای تحریک کنترل شده تخمدان مانند بیمارانی که نیاز به آغاز درمان های گنادوتوکسیک دارند و بیمارانی که تومورهای حساس به هورمون دارند، کاربرد دارد. میزان باروری اووسیت در آزمایشگاه نسبت به اووسیت بالغ شده در محیط In Vivo بسیار کمتر و کندتر است. این مسئله ضرورت پژوهش بیشتر در این زمینه را ایجاد می کند (۲). رادیکالهای آزاد (ROS) Reactive oxygen species، و تاثیر مخرب آنها بر القاء آپوپتوز در مراحل مختلف رشد تخمک از جمله فولیکولوژنیزس، آتزی فولیکولار، تخمک گذاری و بلوغ تخمک و تشکیل جسم زرد در تحقیقات گذشته به اثبات رسیده است. با توجه به اینکه کشت تخمک در محیط آزمایشگاه IVM خود مسبب ایجاد استرس های اکسیداتیو به تخمک و القاء آپوپتوز می شود، حفاظت از تخمک و بلاستوسیت از این اثرات مخرب در محیط کشت بسیار حائز اهمیت است (۳).

آپوپتوز یک واژه ی یونانی و به معنی ریزش برگ درختان پاییزی است (۴). شکل گیری اندام ها و بافت های بدن انسان در دوره ی جنینی و کنترل میزان رشد و تکثیر سلولی همگی از نتایج این پدیده است (۵). در حال حاضر پذیرفته شده است که علت از بین رفتن تخمک ها در جنین و اوایل زندگی از طریق آپوپتوز است. علل متعدد مرگ تخمک ها هنوز شناخته شده نیست با این وجود، علی رغم اینکه در بیشتر تخمک ها احتمال آپوپتوز وجود دارد گرسنگی طولانی مدت می تواند شروع کننده ی آپوپتوز باشد (۶). King و coll نشان دادند که تخمک های جنینی مستعد اتوفازی هستند و اگر فاکتور های رشد کافی برای حفظ تخمک نرسد، مرگ تخمک ها فرا می رسد (۶). آپوپتوز هم مانند تمام مسیرهای سلولی از مسیرهای مشخص و توسط تحریکهای خاص القا می شود. این تحریکها اغلب منشاء درون سلولی دارند و می توان آنها را به چهار دسته ی اصلی طبقه بندی کرد ۱- اشعه و یا سموم ۲- پیام فقدان و یا کمبود عوامل رشد و یا هورمون ها ۳- فعال شدن از طریق اتصال به لیگاند ۴- فعال سازی از طریق سلول های سیستم ایمنی (۷). پیام مرگ از مسیر های فوق به سلول ابلاغ و سلول از طریق مسیر گیرنده ی لیگاند یا مسیر میتوکندریایی آماده ی مرگ می شود.

انتخاب محیط کشت و مکمل های مناسب، تأثیر زیادی بر رشد و عملکرد سلول های جنینی در محیط خارج از بدن دارد. تا به امروز سیستم های کشت متعددی در راستای ارتقای مطالعات ناباروری ابداع گردیده است (۸). هرچند که نتایج حمایت کننده از تولید سلول های زایای بدوی عملکردی در محیط In vitro گسترده نیست، اما این مطالعات نشان دهنده تلاش های در زمینه تولید و تشخیص این سلول ها در محیط آزمایشگاه می باشد. با وجود تحقیقات انجام شده، انجام مطالعات گسترده تر جهت تشخیص شرایط صحیح کشت شامل مکمل های تغذیه ای مناسب کشت میتواند در تکامل سلولهای زایا موثر باشد. در این مورد محیط کشت های مختلف همراه با مکمل و هورمون های متفاوت در جهت رشد، بلوغ و لقاح داخل آزمایشگاهی اووسیت در گونه های مختلف توسط محققین مورد بررسی قرار گرفته است. به طور مثال مطالعه ای نشان می دهد که در پاسخ به LH افزایش تولید پروژسترون و پروستاگلاندین

از سلول های کومولوس و همچنین تولید GDF9 و BMP15 توسط اووسیت رخ می دهد. این فاکتورها برای تشکیل ماتریکس خارج سلولی غنی از هیالورونان توسط COCs ضروری هستند. محیط کشت IVM اووسیت برای کشت کمپلکس اووسیت COCs ضروری است. COC حاوی ۵۰۰۰-۱۰۰۰ سلول کومولوس و یک اووسیت می باشد. محیط های کشت پیچیده ای هستند که قادرند نیازهای بالای COC را حمایت کنند. زمانی که فولیکول ها در شرایط In Vitro کشت داده می شوند شرایط موجود و مواد غذایی محیط کشت در میزان زیست پذیری، رشد، بلوغ اووسیت و میزان اووسیت هایی که می توانند تخمک گذاری کنند بسیار اهمیت دارد (۹). بنابراین کشف این شرایط احتیاج به پژوهش بیشتر دارد، فراهم نمودن مواد غذایی لازم و فاکتورهای طبیعی برای بلوغ اووسیت حیاتی است (۱۰). تحقیقاتی که توسط G.L.Rios و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در آرژانتین صورت گرفت، نشان داد که با اضافه نمودن فاکتورهای رشد و هورمون ها، بلوغ هسته ای و سیتوپلاسمی اووسیت تقویت می شود و کفایت قبل از لانه گزینی و تکامل رویان و جنین بهتر می شود. در مطالعه مذکور یک اثر مثبت روی آزاد شدن جسم قطبی اووسیت بالغ شده گوساله در محیط کشت حاوی EGF:Epithelial growth factor و HA: hyaloronic acid دیده شده است. EGF و IGF1:Insulin-like growth factor آزاد شدن اولین جسم قطبی و فعالیت میتوژنیک پروتیین کیناز را افزایش می دهد (۱۱). در سال ۲۰۰۹ I.M.Farag و همکارانش با اضافه کردن هورمون ترکیبی (E2,HCG,PMSG) به محیط کشت TCM-199 پیشرفت چشمگیری در سرعت IVM اووسیت گوسفند مشاهده شد (۱۲). اضافه نمودن هورمون های ترکیبی گنادوتروپین و استرادیول با یک منبع Sera از قبیل Estrous Goat Serum (EGS) به محیط کشت TCM199 برای بالغ شدن ۷۲/۴٪ اووسیت لازم است (۱۳). زمانی که هورمون های ترکیبی (E2,FSH,LH) به محیط کشت افزوده میشود، سرعت تقسیم کلیواژ اووسیت لقاح یافته به طور چشمگیر افزایش یافت و تا ۶۹ درصد پیشرفت می کند (۱۴). همچنین FSH: Follicle-Stimulated Hormon بلوغ اووسیت و تخمک گذاری را تحریک می کند و همچنین FSH از آپوپتوز سلول های گرانولوزا در محیط Invitro و In vivo پیشگیری می کند. همچنین اضافه نمودن FSH به محیط کشت زیست پذیری فولیکول ها را افزایش می دهد (۱۵). فرایند آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول به عنوان روشی حفاظت شده، تحت کنترل ژن هاست که به منظور حذف سلول های ناخواسته یا غیرضروری در موجودات زنده به کار می رود و در بسیاری از مکانیسم های سیستم ایمنی یا بیماری ها مداخله می کند. همچنین رویان در گونه های مختلف هم در بخش توده سلولی داخلی و هم در گروه سلول های تروفوکتودرم متحمل این پدیده می شوند که نقش بسیار مهم آپوپتوز در روال تکامل نرمال رویان در این گونه ها به اثبات رسیده است اما نقش دقیق آن در پروسه رشد و تکامل رویان هنوز دارای ابهامات فراوانی است (۱۶).

آتورواستاتین دارویی از دسته ی استاتین ها (HMG-CoA reductase inhibitors) می باشد که به جهت کاهش میزان چربی خون در بیماران به کار گرفته می شود. مکانیسم اثر این دارو مهار آنزیم hydroxy3 methylglutaryl 3 CoA reductase (آنزیم کبدی موثر در تولید کلسترول) است. (۱۷)

در مطالعات نشان داده شده آتورواستاتین از طریق مهار آنزیم NOX2 با استرس اکسیداتیو مقابله و به عنوان یک آنتی اکسیدانت در بدن ایفای نقش می کند. (۱۸) در مطالعاتی دیگر نشان داده شد پس از مصرف آتورواستاتین، پارامترهای خونی ناشی از استرس اکسیداتیو مانند MDA در نمونه های خون بیماران به طور معنی داری کاهش می یابد. به علاوه کلسترول بالا خود یکی از عوامل استرس اکسیداتیو در بدن محسوب می شود که اتورواستاتین نقش موثری در کاهش آن ایفا می کند. (۱۹،۲۰)

همچنین در مطالعه ای دیگر برای بررسی اثر آتورواستاتین بر قدرت باروری جنس مذکر، تاثیر مصرف آتورواستاتین بر پارامترهای semen در ۱۰ گروه سگ نر نژاد بیگل برای مدت ۲ سال بررسی شد که تاثیر به سزا و قابل توجهی درافزایش تعداد اسپرم در هر نمونه، میزان حرکت اسپرم، و بهبود مورفولوژی اسپرم ها دیده شد. (۲۱)

استفاده همزمان از آنتی اکسیدان هایی مانند ویتامین E، ویتامین C، گلووتاتیون و ... در مطالعات مختلف صورت پذیرفته است. در مطالعه صورت گرفته توسط Gitto و همکاران، اثرات سینرژیستی محافظتی ملاتونین و دیگر آنتی اکسیدان ها در پیشگیری از پراکسیداسیون لیپید ناشی از آهن مورد بررسی قرار گرفت (۲۲).

در محیط کشت هایی که فولیکول ها در فقدان آنتی اکسیدان کشت داده شده اند میزان فعالیت گلووتاتیون S ترانسفراز و سوپراکساید افزایش می یابد در نتیجه میزان آسیب های سلولی و درصد آپوپتوز هم به طور قابل توجهی افزایش می یابد (۲۳،۲۴). تحقیقی که بر روی اثر ملاتونین بر روی بلوغ، لقاح و تکوین رویانی تخمک ها ی موش در شرایط آزمایشگاهی انجام شد نشان داد که اضافه کردن ملاتونین و آل ترانس رتینوئیک اسید با هم به محیط کشت سبب افزایش بلوغ و بهبود تکوین جنین های حاصل شد (۲۵).

با توجه به اینکه آنتی اکسیدان ها قدرت زیست پذیری فولیکول ها و تخمک را افزایش و میزان آپوپتوز را کاهش میدهند و از آن رو که آتورواستاتین جزء آنتی اکسیدان های خیلی قوی است در این مقاله برآنیم که تاثیر افزودن آتورواستاتین به محیط کشت را بر روند آپوپتوز اووسیت های موش سوری که به روش IVM تولید شدند، بررسی نماییم.

※ طرح بنیادی: طرحی است که دارای نتایج بالقوه بوده و نتایج حاصل ازانجام آن را نتوان بلافاصله پس از اتمام طرح استفاده کرد.

※※ طرح کاربردی: طرحی است که دارای نتایج بالفعل بوده و نتایج حاصل ازانجام آن بلافاصله پس از اتمام طرح قابل استفاده باشد.